

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

- (22) Přihlášeno: **08.05.2002**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.05.2001**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/011008**  
(33) Země priority: **FI**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:  
**(Věstník č: 3/2004)**  
(86) PCT číslo: **PCT/FI2002/000393**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/091850**

(21) Číslo dokumentu:

**2003-3099**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. :  
**A23K 1/00**  
**A23L 1/09**

- (71) Přihlašovatel:  
SUOMEN REHU OY, Helsinky, FI
- (72) Původce:  
Vuorenmaa Juhani, Tampere, FI  
Rautonen Nina, Espoo, FI
- (74) Zástupce:  
Krmenečik Václav Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název přihlášky vynálezu:  
**Způsob výroby nutriční přísady, nutriční  
přísada a její použití**

- (57) Anotace:  
Způsob výroby nutriční přísady pro použití při prevenci střevních onemocnění spočívá v tom, že se pivovarské droždí zfiltruje a zfiltrované pivovarské droždí se upravuje hydrolyticky, takže se buněčná struktura štěpí a účinná koncentrace oligosacharidů a/nebo polysacharidů, betaglukanu a/nebo proteinů se zvýší. Nutriční přísada je vyrobená úpravou zfiltrovaného pivovarského droždí hydrolýzou tak, aby se buněčná struktura štěpila. Použití nutriční přísady v souvislosti s krměním zvířat, přičemž se přísada používá v množství 0,1 až 1,0 % hmotn. celkového množství suroviny. Použití uvedené nutriční přísady pro lidi za účelem dosažení rovnovážného stavu střevní mikroflóry a prevenci střevních onemocnění.

CZ 2003 - 3099 A3

Způsob výroby nutriční přísady, nutriční přísada a její použití

### Oblast techniky

Tento vynález se týká způsobu definovaného v předvýznamu nároku 1 pro přípravu nutriční přísady. Vynález se též týká nutriční přísady, jejího použití a přípravku, který ji obsahuje.

Mikrobiální rovnováha ve střevech je předpokladem zdraví, pohody i produktivity živočichů. Poruchy této rovnováhy se projevují jako průjmy a jiné střevní zdravotní problémy a mohou vést i k uhynutí živočichů.

### Dosavadní stav techniky

Zvířata s jednoduchým žaludkem se proti vlivu škodlivých mikrobů chrání přidávkem různých antibiotik a chemoterapeutik bránících mikrobiálnímu množení do krmiva určeného pro zkrmování zvířaty. Rovněž lze do krmiv přidávat probiotické výrobky jako jsou různé mikroby, kyseliny a droždí s cílem zachovat střevní mikrobiální rovnováhu a vyhnout se použití antibiotik. Také existují krmivové směsi s přidávkem oligosacharidů pro inhibici pomnožování škodlivých mikrobů a podporu množení žádoucích mikrobů. Patentová přihláška FI 965192 dále popisuje hydrolyzát droždí obsahující oligosacharidy a/nebo polysacharidy a jeho použití pro prevenci střevních onemocnění.

Používání antibiotik v sobě nese nebezpečí vzniku mikrobiálních kmenů imunních proti antibiotikům s následnými riziky pro zdraví člověka. Problémem probiotických výrobků je jejich proměnlivá a obecně nízká účinnost; kromě toho jsou náklady jejich užití dosti vysoké. Podobně je problémem krmiva obsahujícího čisté oligosacharidy a dříve známých krmiv obsahujících oligosacharidy a/nebo polysacharidy proměnlivá a obecně příliš slabá účinnost oligosacharidů a/nebo polysacharidů při prevenci střevních onemocnění. Navíc je cena čistých oligosacharidů vysoká.

Cílem tohoto vynálezu je odstranit výše zmíněné

Cílem tohoto vynálezu je odstranit výše zmíněné nedostatky.

### Podstata vynálezu

Specifickým cílem tohoto vynálezu je popsat způsob přípravy nutriční přísady vykazující mnohem větší vliv na střevní mikroby a tím podporující zdraví a/nebo přírůstky hospodářských zvířat.

Dalším cílem tohoto vynálezu je popsat účinnou nutriční přísadu v homogenní kvalitě použitelnou pro omezení střevních chorob zvířat úsporným způsobem.

Dalším cílem tohoto vynálezu je popsat použití nové přísady vyráběné podle vynálezu a přípravek, který ji obsahuje.

Pokud jde o charakteristické znaky vynálezu odkazujeme na patentové nároky.

Ve způsobu podle vynálezu pro výrobu nutriční přísady se zfiltruje pivovarské droždí a zpracuje se tak, aby se změnila jeho buněčná struktura a vzrostla účinná koncentrace oligosacharidů a/nebo polysacharidů, betaglukanu a/nebo proteinů na povrchu buněčných struktur, to znamená že se buněčná struktura štěpí a uvolní oligosacharidy a/nebo polysacharidy, betaglukan a/nebo proteiny pro užití při prevenci střevních onemocnění.

Vynález také popisuje výrobky připravené tímto způsobem, jejich použití a přípravky obsahující přísady v souladu s patentovými nároky.

Vynález se zakládá na provedené výzkumné práci zkoumající nutriční přísady, při které byl učiněn nečekaný objev, že když se pivovarské droždí nejprve zfiltruje a dále hydrolyticky zpracuje tak, aby se rozrušila buněčná struktura pivovarského droždí, získá se produkt, který při podání hospodářskému zvířeti spolu s krmivem potlačuje střevní onemocnění zvířat účinněji než produkt získaný samotnou hydrolýzou pivovarských kvasnic.

Mechanismus účinku takto získaného produktu při prevenci střevních onemocnění se zakládá na skutečnosti, že jeho užití

spolu s krmivem brání přichycení mikrobů na stěnu střev, což znamená, že oligosacharidy a/nebo polysacharidy a/nebo proteiny uvolněné při filtraci pivovarského droždí a štěpení jeho buněčné struktury fungují ve střevu podobně jako receptory škodlivých mikrobů jako je E.coli a tím oslabují schopnost mikrobů přichycovat se na střevní stěny.

Dále jsou oligosacharidy a/nebo polysacharidy, betaglukan, proteiny, nukleotidy, peptidy a/nebo další látky uvolněné při zmíněném štěpení buněčné struktury pivovarského droždí užitečné při regulování střevní mikrobiální populace.

Produkty štěpení získané filtrací a hydrolýzou mají vliv na imunitní odpověď zvířat, což znamená, že určité složky pivovarských kvasnic, například glycidické složky obsahující fosfor v droždí, mohou zlepšit imunitní odpověď zvířat a tím zabránit vzniku střevních onemocnění. Výrobním postupem lze navíc ovlivnit typ a intenzitu této imunitní odpovědi.

Pivovarské droždí se získává jako vedlejší produkt v pivovarském průmyslu. Normálně směs pivovarského droždí přechází na konci postupu výroby piva do skladovacích nádrží, kde se pivovarské droždí ukládá na dně nádrže. Potom se stáčí pivo jako svrchní vrstva. Obsah sušiny v takto získaném pivovarském droždí obvykle kolísá v rozmezí 7 - 13 % hmotn.

Při způsobu podle vynálezu se pivovarské droždí uložené na dně nádrže filtruje mechanicky a/nebo pneumaticky. Pivovarské droždí se může filtrovat kterýmkoliv známým filtračním způsobem. Aby se předešlo zanesení filtru, například filtračních desek, je možno použít vibrátoru, například vysokofrekvenčního mikrovibrátoru a/nebo jiné odpovídající techniky bránící zanášení filtru. Hustota filtru se zvolí podle velikosti částic droždí.

Obsah sušiny v pivovarském droždí filtrovaném podle vynálezu je nejméně 15 % hmotn., výhodně 18 - 20 % hmotn.

V používaném pivovarském droždí jsou na buněčné struktury suroviny vázány oligosacharidy a/nebo polysacharidy, betaglukan a proteiny jako například mannoprotein.

Ve způsobu podle vynálezu se buněčná struktura

pivovarských kvasnic hydrolyticky štěpí pomocí kyseliny nebo alkalického činidla, autolýzou a/nebo enzymaticky. Vedle hydrolýzy lze k rozkladu pivovarského droždí užít působení tepla a/nebo tenzidu a/nebo jiného způsobu narušení buněčné struktury suroviny, například expozice buněčné struktury působení mechanické, hydrostatické a/nebo pneumatické síly.

Kyseliny použité při hydrolýze mohou být například běžné minerální kyseliny jako kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, kyselina fosforečná, kyselina dusičná a pod., stejně jako silné organické kyseliny jako například kyselina mravenčí, kyselina octová, kyselina propionová a pod. Rozmezí pH použité při hydrolýze může být pod 4, například od asi 2 do 4. Při alkalické hydrolýze mohou být použita alkalická činidla, například běžné alkalické hydroxidy jako je hydroxid sodný, hydroxid draselný apod., hydroxid amonný, nebo jiná alkalická činidla uvolňující oligosacharidy a/nebo polysacharidy.

Enzymy použitelné při enzymatické hydrolýze zahrnují například různé proteázy, například kyselé nebo zásadité proteázy. Při hydrolýze je též možno použít enzym přítomný v samotném pivovarském droždí, takže hydrolýza probíhá cestou autolýzy. Dále se může hydrolýza uskutečnit s použitím dalších přidaných enzymů, proteáz, ribonukleáz a deamináz. Při enzymatickém zpracování je též možno použít kombinace několika enzymů, nasazených buď současně a/nebo po sobě, například papainu, ribonukleázy a/nebo deaminázy. Obecně lze tento způsob realizovat pomocí enzymů uvedených ve specifikacích uváděných v dalším a/nebo jiných známých enzymů, které mají potřebný účinek štěpení buněčné struktury suroviny, a to společně nebo odděleně, například jak se uvádí v níže uváděných specifikacích.

Při hydrolýze se může droždí zahřívát na teplotu překračující 40 °C, při autolýze a enzymatické hydrolýze například na teplotu mezi 40 °C a 65 °C a při kyselé a zásadité hydrolýze například na 70 °C až 95 °C. Doba zahřívání se může v závislosti na teplotě měnit v rozmezí například od 1 do 12 hodin.

Ner rozpustné a rozpustné frakce získané hydrolýzou obsahují potřebné oligosacharidy a/nebo polysacharidy, betaglukan a/nebo proteiny.

Hydrolytické štěpení droždí se popisuje v podlohách patentových přihlášek a v patentových přihláškách: FI 965192, WO 96/38057 a GB 1032687. Tyto způsoby i ostatní známé způsoby se mohou použít ve spojení s tímto vynálezem, když má být použitelný produkt záměrně nefrakcionovaný produkt jako takový, nebo jeho nerozpustná nebo rozpustná frakce.

Produkt vyrobený způsobem podle vynálezu se může ke krmivu nebo potravině přidat přímo jako takový v navlhčené nebo suché podobě a rovněž se může žádoucím způsobem upravovat.

Nutriční přísada vyrobená způsobem podle vynálezu se může pro prevenci střevních onemocnění použít v krmivech určených pro zvířata s jednoduchým žaludkem, například prasata, zejména vepře, drůbež, například slepice, broilery a krůty, mláďata dalších zvířat, kožešinová zvířata jako jsou lišky nebo různí domácí mazlíčci jako psi a kočky, dále koně, zvláště hřibata, ryby a podobně. Množství nutriční přísady použité v krmivech a výživě zvířat s jednoduchým žaludkem může být 0,01 až 1,0 % hmotn., výhodně 0,1 až 0,3 % hmotn. celkového množství krmiva v přepočtu na sušinu. Příklad se může podávat společně s krmivem nebo výživou nebo samotná. Vhodné použití přísady je při denním příjmu 0,1 až 10 g denně, výhodně 0,1 až 3 g denně.

Nutriční přísada podle vynálezu se může aplikovat i v potravinách pro lidi, například v potravinářských výrobcích pro děti nebo pro dospělé nebo jako přípravek podávaný samostatně pro podporu zdraví, pro dosažení rovnovážného stavu střevních mikrobů a pro prevenci střevních onemocnění.

Jako přídatek do krmiva pro zvířata je přísada vyrobená způsobem podle vynálezu o asi 25 % až 30 % účinnější při inhibici množení škodlivých mikrobů a podpoře množení prospěšných mikrobů než výrobek z nefiltrovaného pivovarského droždí. Současně se zlepšují přírůstky zvířat, využití krmiva a zlepšuje se též celková výrobní bilance. Navíc se v tomto výrobku zachovávají užitečné složky droždí. Vynález dále umožňuje

úspornější výrobu přísady a přípravku podle vynálezu.

Kromě toho používání krmivářských výrobků podle vynálezu, to znamená přírodních krmivářských výrobků v krmivu pro zvířata poskytuje možnost skončit s užíváním antibiotik v krmivech. Tím se zmenší riziko vzniku mikrobiálních kmenů imunních proti antibiotikům a sníží se s tím spojené zdravotní ohrožení spotřebitelů.

V dalším se vynález podrobně popíše s odkazem na následující příklady provedení.

### Příklady provedení vynálezu

#### PŘÍKLAD 1

V jednom pokusu se vyrobila nutriční přísada podle vynálezu z pivovarského droždí s obsahem sušiny 9 % hmotn. získaného z pivovarské výroby.

Pivovarské droždí se mechanicky zfiltrovalo jemným filtrem při vysokofrekvenční vibraci filtračních desek pomocí mikrovibrátoru. Droždí se zfiltrovalo na obsah sušiny 18 % hmotn. Při filtraci se s kapalnou složkou odneslo 3 - 4 % sušiny a výtěžek sušiny z droždí byl odhadem 50 - 60 %.

Zfiltrované pivovarské droždí se hydrolyzovalo kyselinou. Při hydrolyze se pH suspenze droždí udržovalo na hodnotě 2 - 3 pomocí silné kyseliny (4 hod.) a při teplotě 70 - 85 °C. Potom se pH zvýšilo na hodnotu 4 - 5 a získaný produkt se ochladil. Získaný finální produkt se může užít jako takový nebo se může známými způsoby sušit.

#### PŘÍKLAD 2

V tomto experimentu se na plotnách pro mikrotitry srovnával účinek hydrolyzátu z droždí připraveného v příkladu 1 na přichycení bakterie E. coli na prasečí slizniční membránu s odpovídajícím účinkem hydrolyzátu droždí připraveného způsobem popsáním v patentové přihlášce FI 965192; tento pokus se popisuje ve stati Convay, P.L. (1990), Infection and Imunity, sv. 58, ss. 3178-3182. Přítomnost receptorů specifických pro

K88 v prasečím střevním hlenu závisí na věku zvířete.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Množství analyzovaného zkušebního materiálu, %	Adheze E. coli, %			
	Kontrola	Hydrolyzát, nezfiltro- vané droždí	Hydrolyzát, zfiltrované droždí	Zfiltrované z nezfiltro- vaného materiálu, %
	100			
0,16		21,4	16,2	76
0,08		45,8	32,4	71
0,016		82,3	60,7	74

Z výsledků je zřejmé, že přísada podle vynálezu byla mnohem účinnější (asi o 25 - 30 %) při inhibici adheze E. coli než produkt z nezfiltrovaného pivovarského droždí.

### PŘÍKLAD 3

Byl proveden pokus pro zjištění účinku hydrolyzátu droždí připraveného v příkladu 1 a hydrolyzátu 2 připraveného podle vynálezu na střevní imunitu krys. Imunita se stanovila změřením obsahu imunoglobulinu IgA v zažívacím traktu a určením poměru imunních buněk ze vzorků střevní tkáně. Srovnávací stanovení byla provedena za pomoci kontrolního vzorku a betaglukanového produktu.

V každém pokusu se použilo 6 krys. Tkáňové vzorky se odebraly z dvanáctníku a kyčelníku 28 dní od začátku pokusu s krmivem. Vzorky se zředily a jejich obsah IgA se stanovil novým imunoenzymatickým způsobem ELISA, určeným k měření imunitní odpovědi na úrovni střev. Při starších způsobech se imunita měřila nepřímo z tkáňových kultur nebo vzorků krve. Při dnes používaném způsobu je možno ve střevě měřit jak buněčnou imunitu, tak humorální (protilátkovou) imunitu a tímto způsobem přímo měřit inhibiční účinek různých produktů proti střevním onemocněním. Při těchto stanoveních se použilo monoklonálních protilátek specifických pro imunní buňky krys.

Produkt podle vynálezu (0,3 %) a betaglukan neměly velký vliv na obsah IgA v zažívacím traktu. Obě látky však obsah IgA ve srovnání s kontrolním pokusem zvyšovaly. V menších dávkách produkt podle vynálezu zvyšoval obsah imunoglobulinu IgA, jak je zřejmé ze srovnání s kontrolním pokusem.

Četnosti makrofágů a buněk nabízejících proteinu CD8 antigen (CD8-pozitivních) (pozitivní buňky/0,5 klku) ukazuje tabulka 2.

Tabulka 2

	Kontrolní pokus	Betaglukan	Hydrolyzát z příkladu 1	Hydrolyzát 2
Makrofágy	8,2	5,8	15,7	13,0
CD8+	8,5	13,0	19,5	15,0

Z tabulky 2 je zřejmé, že produkt podle vynálezu způsobil značné zvýšení četnosti buněk makrofágu a určité zvýšení četnosti CD8-pozitivních buněk. Produkt podle vynálezu místně stimuloval v zažívacím traktu takové typy imunitní odpovědi, jež mají význam zvláště při vnitrobuněčných infekcích (viry, paraziti a bakterie množící se v buňkách) a poskytují další ochranu i proti jiným infekcím než které způsobuje E. coli, zatímco betaglukanový produkt byl více nebo méně neúčinný.

Vynález se neomezuje jen na výše popsané příklady jeho realizace, naopak jsou možné jeho obměny v rozsahu inventivní myšlenky definované v nárocích.

**P A T E N T O V É N Á R O K Y**

**(Změněné)**

1. Způsob výroby nutriční přísady pro použití při prevenci střevních onemocnění, ve kterém se pivovarské droždí upravuje hydrolýzou, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pivovarské droždí filtruje a zfiltrované pivovarské droždí se upraví hydrolyticky tak, aby se buněčná struktura štěpila a vzrostla účinná koncentrace oligosacharidů a/nebo polysacharidů, betaglukanu a/nebo proteinů na povrchu buněčných struktur.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pivovarské droždí filtruje mechanicky.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pivovarské droždí filtruje na minimální obsah sušiny 15 %, výhodně na obsah sušiny 18 až 20 %.

4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zfiltrované pivovarské droždí upravuje kyselinou a/nebo zásadou.

5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zfiltrované pivovarské droždí upravuje enzymaticky.

6. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zfiltrované pivovarské droždí upravuje teplem a/nebo mechanicky, hydrostaticky nebo pneumaticky, takže se buněčná struktura štěpí.

7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se získaný produkt používá jako takový bez frakcionace.

8. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se získaný oligosacharid a/nebo polysacharid, betaglukan a/nebo protein přidá ke krmivu nebo výživě v množství 0,01 až 1,0 % hmotn., výhodně 0,1 až 0,3 % hmotn. v přepočtu na sušinu.

9. Nutriční přísada pro prevenci střevních onemocnění, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato přísada vyrábí úpravou zfiltrovaného pivovarského droždí hydrolýzou, tak aby se buněčná struktura štěpila a vzrostla účinná koncentrace oligosacharidů a/nebo polysacharidů, betaglukanu a/nebo proteinů na povrchu buněčných struktur.

10. Přísada podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato přísada vyrábí mechanickou filtrací pivovarského droždí.

11. Přísada podle nároku 9 nebo 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato přísada vyrábí úpravou suroviny kyselinou a/nebo zásadou.

12. Přísada podle kteréhokoliv z nároků 9 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se tato přísada vyrábí enzymatickou úpravou suroviny.

13. Přísada podle kteréhokoliv z nároků 9 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se pivovarské droždí upravuje teplem a/nebo mechanicky, hydrostaticky nebo pneumaticky, tak aby se buněčná struktura štěpila.

14. Použití nutriční přísady definované v kterémkoliv z nároků 9 až 13 v souvislosti s přípravou výživy určené pro prevenci střevních onemocnění, přičemž je množství použité přísady smíchané s dalšími složkami výživy mezi 0,01 až 1,0 % hmotn., výhodně 0,1 až 0,3 % hmotn.

15. Přípravek obsahující nutriční přísadu a určený k podávání krmnému zvířeti, v y z n a č u j í c í s e t í m, že tento přípravek obsahuje produkt definovaný v kterémkoliv z nároků 10 až 15 v množství 0,01 až 1,0 % hmotn., výhodně 0,1 až 0,3 % hmotn. denní dávky potraviny nebo krmiva.